

REC'D 09 JUL 2004

WIPO

PCT

# BREVET D'INVENTION

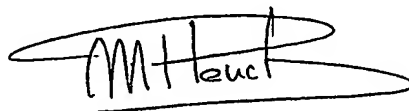
CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 26 MARS 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets



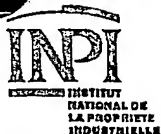
Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*02

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 6 W / 010301

REMISE DES PIÈCES DATE <b>04 JUIL 2003</b> LIEU <b>69 INPI LYON</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>04 JUIL. 2003</b> <b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif) <b>71452BFR1LSAVF</b>		<b>1</b> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE  Cabinet BEAU DE LOMENIE 51 Avenue Jean Jaurès B.P. 7073  69301 LYON CEDEX 07	
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2</b> NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/> N° _____ Date _____	
<b>3</b> TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) MILIEU DE CONSERVATION D'ORGANES, DE TISSUS BIOLOGIQUES OU DE CELLULES VIVANTES			
<b>4</b> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5</b> DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		STEM ALPHA	
Prénoms			
Forme juridique		Société Anonyme à conseil d'administration	
N° SIREN		14 18 83 02 20	
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	Parc d'Activité Innovante Axon	
	Code postal et ville	69 93 01 SAINT CLEMENT LES PLACES	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		française	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page

**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**  
page 2/2

**BR2**

REMISE DES PIÈCES **4 JUIN 2003** Passé à l'INPI  
DATE **69 INPI LYON**  
LIEU  
N° D'ENREGISTREMENT **0308206**  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 G W / 010201

<b>Vos références pour ce dossier :</b> (facultatif)		71452BFR1LSA/VF
<b>6 MANDATAIRE</b> (s'il y a lieu)		
Nom		SARLIN
Prénom		Laure
Cabinet ou Société		Cabinet BEAU DE LOMENIE
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	51, Avenue Jean Jaurès B.P. 7073
	Code postal et ville	69 03 01 LYON CEDEX 07
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)		04 72 76 85 30
N° de télécopie (facultatif)		04 78 69 86 82
Adresse électronique (facultatif)		contact@cabinetbeaudelomenie.fr
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		
Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques		
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'Inventeur(s)
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		
Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)		
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) Laure SARLIN Conseil en P.I. N° 02-0502		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>  

La présente invention concerne le domaine technique de la conservation de cellules vivantes. Plus précisément, l'invention a pour objet un nouveau milieu de conservation d'organes, de tissus biologiques ou de cellules vivantes, en particulier de cornées humaines vivantes.

5 Dans le domaine des greffes d'organes, lorsqu'un organe est prélevé sur un donneur, en vue d'être greffé sur un receveur, il est nécessaire de posséder un milieu de conservation de l'organe apte à maintenir sa vitalité pour une bonne prise du greffon. En fait, bien souvent, différents milieux sont nécessaires. Dans le cas de cornées humaines notamment, on utilise généralement :

- 10 - un milieu de transport pour l'acheminement des cornées du site de prélèvement au centre de culture, d'une part, et du centre de culture au site de la greffe, d'autre part,
- un milieu de conservation. La conservation a lieu, le plus souvent, à 4°C ou 31° C. Ce milieu doit garantir une conservation optimale de la
- 15 viabilité cellulaire à moyen terme, soit environ 4 à 5 semaines, une sécurité maximale en termes de qualité (contrôle endothélial), de stérilité (contrôles bactériologiques, sérologiques et virologiques), et
- un milieu de déturgescence, utilisé environ 24 heures avant la greffe, afin de réduire l'épaisseur de la cornée et la rendre transparente.

20 La plupart des milieux utilisés actuellement contiennent des composants d'origine animale : sérum albumine de veau foetal, protéine d'origine animale de type transferrine, insuline...

Du fait de la présence de composants d'origine animale dans ces milieux, il est difficile d'en garantir la sécurité sanitaire vis-à-vis des maladies à prions, notamment

25 de la maladie de Kreutzfeld Jacob. De plus, ces milieux sont susceptibles d'être contaminés par des agents infectieux et n'ont pas une composition parfaitement reproductible.

Dans ce contexte, la présente invention a pour objectif de fournir un nouveau milieu de conservation préservant la viabilité des cellules vivantes.

30 Un autre objectif de l'invention est de fournir un milieu de conservation à faible coût de revient, du fait des composants qu'il contient.

Le milieu de conservation selon la présente invention se doit également de présenter une sécurité maximale en termes de qualité et de stérilité.

De plus, il présente l'avantage de pouvoir être préparé à partir de composants entièrement synthétiques, c'est-à-dire issus de la synthèse chimique et recombinante, donc non immunogènes et non contaminés par des agents infectieux. Par conséquent, le milieu de conservation selon l'invention peut présenter une composition définie reproductible d'un lot à l'autre.

Plus précisément, l'invention concerne un milieu de conservation d'organes, de tissus biologiques ou de cellules vivantes contenant un acide hyaluronique de haut poids moléculaire et du chlorure de sodium.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un tel milieu pour la conservation, l'organoculture, le transport ou la déturgescence d'organes, de tissus biologiques ou de cellules vivantes et en particulier de cornées humaines vivantes.

Par organes, cellules ou tissus biologiques vivants, on entend des composants d'origine humaine ou animale comprenant des fibroblastes, des cellules endothéliales et/ou des cellules épithéliales vivantes.

Le milieu de conservation de l'invention peut être qualifié de produit thérapeutique annexe.

Le milieu de conservation selon l'invention contient des substances viscoélastiques (SVE) destinées à protéger les cellules endothéliales et les tissus environnants. Ces substances viscoélastiques sont notamment l'acide hyaluronique de haut poids moléculaire.

L'acide hyaluronique de haut poids moléculaire, c'est-à-dire de poids moléculaire supérieur ou égal à 1 million de Daltons, peut être d'origine animale, extrait de la crête de coq ou du sang de cordon, d'origine bactérienne (de cultures de streptocoques) ou d'origine végétale.

Bien entendu, le milieu de conservation selon l'invention contiendra, de préférence, de l'acide hyaluronique de haut poids moléculaire d'origine végétale. En particulier, pour la préparation du milieu de conservation de l'invention, on utilisera de l'acide hyaluronique de haut poids moléculaire issu du blé, sous forme de poudre et vendu sous le nom commercial Cristalhyal ou sous forme de solution aqueuse à 1 % et vendu sous le nom commercial Vitalhyal par le laboratoire Bowman

(distributeur société Soliance), présentant un poids moléculaire supérieur ou égal à  $10^6$  Daltons et une viscosité Brookfield à 20° C de 1 500 centipoises.

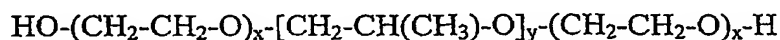
Le milieu de conservation selon l'invention contient également du chlorure de sodium, en tant que cristalloïde. Le chlorure de sodium a notamment pour fonction  
5 d'éviter la précipitation de l'acide hyaluronique, mais aussi participe au maintien de l'osmolarité.

En particulier, le milieu de conservation selon l'invention contient :

- de 80 à 4000 mg/l, de préférence 100 à 200 mg/l, préférentiellement de 100 à 160 mg/l d'acide hyaluronique de haut poids moléculaire, et
- 10 - de 4500 à 9000 mg/l, de préférence de 5500 à 9000 mg/l, préférentiellement 7000 mg/l de chlorure de sodium.

De façon avantageuse, le milieu selon l'invention contiendra du poloxamer 188 qui a notamment pour fonction d'augmenter la viscosité du milieu.

Le poloxamer 188, également nommé Pluronic F68 ou Lutrol® F68 est un  
15 polymère séquencé de polyoxyéthylène-polyoxypropylène de poids moléculaire 7680-950 g/mol et de formule générale :



où x est environ égal à 79 et y environ égal à 28.

La présence de poloxamer 188 est particulièrement avantageuse dans le milieu  
20 selon l'invention, quand ce dernier est destiné à être utilisé pour la déturgescence d'organes et pour le transport et la conservation, de tissus ou cellules vivantes, et, en particulier, de greffons de cornées humaines. Le milieu selon l'invention contiendra, de préférence, de 200 à 75000 mg/l, préférentiellement de 450 à 50000 mg/l de poloxamer 188.

25 Les milieux de conservation actuellement sur le marché, destinés à la déturgescence de cornées contiennent du dextran. Le dextran a pour fonction d'affiner l'épaisseur de la cornée et pourra être utilisé dans les milieux selon l'invention destinés à la déturgescence de cornées. On lui préférera néanmoins le poloxamer 188 qui a également pour effet d'affiner la cornée mais qui est beaucoup  
30 moins cytotoxique.

La méthylcellulose est une autre SVE que peut contenir le milieu de conservation selon l'invention. La méthylcellulose est d'origine végétale et est

obtenue à partir de fibres de cellulose provenant de bourres de coton ou de pulpe de bois. Ces fibres de cellulose sont traitées avec une solution de soude caustique, pour subir une éthérification avec du chlorure de méthylène. Le degré de substitution, correspondant au nombre de substituants méthoxylés par unité glucosidique est  
 5 compris entre 1,64 et 1,92. En particulier, on pourra utiliser pour préparer le milieu de conservation de l'invention la méthylcellulose commercialisée par la société SEPPIC sous le nom commercial Métolose SM 400 de viscosité Brookfield 4000 centipoises (2 % en eau à 20° C) et de poids moléculaire de 86000 Daltons. Le milieu selon l'invention contiendra, de préférence, de 210 à 5000 mg/l, de préférence de  
 10 1900 à 2500 mg/l, préférentiellement 2205 mg/l de méthylcellulose.

Les SVE utilisés permettent une hydratation des cellules par rétention d'eau et présentent une certaine adhésivité ou attachement aux cellules et tissus qu'elles entourent, assurant ainsi la protection de ces derniers contre les attaques chimiques ou les effets toxiques de l'air.

15 Le milieu de conservation selon l'invention contient également d'autres composants plus couramment utilisés dans le domaine de la conservation de cellules vivantes.

En particulier, le milieu de conservation contient une base nutritive biologique liquide qui est en général un milieu de culture cellulaire. En particulier, on pourra  
 20 utiliser l'IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium), base nourricière aqueuse qui contient notamment différents sels inorganiques, dont du chlorure de sodium mais en quantité non suffisante (seulement 4505 mg/l), du glucose et divers acides aminés.

De façon avantageuse, le milieu de conservation selon l'invention contient,  
 25 également, des acides aminés, des oligoéléments, des vitamines, des électrolytes, un tampon stabilisateur de pH.

Le milieu de conservation selon l'invention contient, avantageusement, et, de façon indépendante, de 1 à 50 mg/l de sulfate de chondroïtine, de 0,1 à 25 mg/l d'héparane sulfate, de 500 à 2000 mg/l d'acide alginique, de 1000 à 10000 mg/l  
 30 d'hydroxyéthylamidon.

Dans le cas, où le milieu de conservation est destiné à être utilisé sur des greffons de cornées humaines, il contiendra de préférence des composants présents

dans l'humeur aqueuse tels que le lactate de sodium, l'acétate de sodium, le citrate de sodium, l'ascorbate de fer II, le gluconate de fer II, le pyruvate de sodium et le chlorure de calcium.

Le milieu de conservation selon l'invention peut se présenter sous forme  
5 liquide ou semi-solide. Il présente une viscosité assez importante pour favoriser la protection des cellules. De façon avantageuse, la viscosité Brookfield du milieu de conservation selon l'invention est comprise entre 1 et 15 centipoises (cps) à 20° C, de préférence entre 2,5 et 10 cps.

L'osmolarité du milieu selon l'invention présente également une importance et  
10 est, en particulier, comprise entre 300 et 465 mOsm  $\pm$  40. L'osmolarité du milieu dépend notamment de la concentration en NaCl. Lorsque le milieu selon l'invention est destiné à la conservation ou au transport, son osmolarité sera avantageusement comprise entre 300 et 360 mOsm  $\pm$  40, lorsqu'il est destiné à la déturgescence, son osmolarité est avantageusement comprise entre 350 et 465 mOsm  $\pm$  40. L'osmolarité  
15 des milieux de conservation actuellement sur le marché est moins importante. Un des avantages de l'invention est de pouvoir proposer un seul milieu pour le transport, la conservation et la déturgescence.

Le milieu de conservation selon l'invention est préparé par mélange des différents constituants. De préférence, pour améliorer la dissolution de l'acide  
20 hyaluronique dans la base nutritive biologique liquide, ce dernier sera mélangé au chlorure de sodium, puis ajouté à la base nutritive contenant déjà la méthylcellulose.

De façon avantageuse, le milieu de conservation selon l'invention ne contient aucun composant d'origine animale. En effet, d'une part, contrairement à la plupart des milieux utilisés à ce jour pour la conservation d'organes, de tissus biologiques ou  
25 de cellules vivantes, le milieu selon l'invention est exempt de sérum albumine de veau fœtal, et d'autre part, il est possible d'utiliser des composants, et notamment de l'acide hyaluronique de haut poids moléculaire et de la méthylcellulose, dont la synthèse ne fait intervenir aucune matière première d'origine animale. Un tel milieu de conservation pourra donc facilement être conforme à la législation sur les produits  
30 thérapeutiques annexes définis à l'article L. 1263-1 du Code de la Santé Publique. L'utilisation d'un milieu de conservation exempt de composant d'origine animale permet d'améliorer la sécurité sanitaire des cellules conservées.



Le milieu de conservation selon l'invention pourra être utilisé pour la conservation, l'organoculture, la congélation, le transport ou la déturgescence d'organes, de tissus biologiques ou de cellules vivantes, et en particulier de cornées humaines vivantes.

5 En fonction de l'application envisagée, le milieu de conservation selon l'invention pourra subir certaines adaptations.

Par exemple, dans le cas où le milieu selon l'invention est destiné à être utilisé pour la déturgescence préopératoire, il contiendra avantageusement du poloxamer 188, à raison de 200 à 75000 mg/l, préférentiellement de 450 à 50000 mg/l.

10 Dans le cas, où le milieu est destiné à être utilisé pour la congélation de cellules vivantes, une partie de l'eau présente dans le milieu pourra être remplacée par du diméthylsulfoxyde (DMSO) ayant un effet cryoprotecteur.

Les exemples ci-après illustrent l'invention, mais n'ont aucun caractère limitatif. Dans les exemples ci-après, on utilise de l'acide hyaluronique sous forme de poudre, vendu sous le nom commercial Cristalhyal par le laboratoire Bowman (distributeur société Soliance), de la méthylcellulose commercialisée par la société SEPPIC sous le nom commercial Métolose SM 400 et du NaCl de chez Sigma.

Les osmolarités sont mesurées avec un osmomètre vendu par Fischer Bioblock Scientific sous la référence M85501 (Calibration automatique zéro (eau distillée) et standard (300mOsm/kg) par pression d'une touche. Temps de réponse 1 minute).

20 Les viscosités sont mesurées avec un viscosimètre vendu par Fischer Bioblock Scientific sous la référence M57571 avec un adaptateur faible viscosité à partir de 1cps réf M57510 (Affichage simultané de la vitesse, mobile sélectionné, viscosité en cps et en % de gamme et température. Compatible Brookfield. Les mobiles sont  
25 plongés directement dans l'échantillon).

**Exemple 1 :** Le milieu de l'exemple 1 est avantageusement utilisé pour le transport et la conservation.

	Acide hyaluronique	
30	de haut poids moléculaire	100 mg/l
	Méthylcellulose	2 205 mg/l
	NaCl	6 985 mg/l

	Acides aminés	1 838 mg/l
	Oligoéléments	5 390 mg/l
	Tampon	8 982 mg/l
	pH	7,2 à 7,3
5	Osmolarité	394 mOsm
	Viscosité	5cps (Brookfield 20°C)

**Exemple 2 :** Le milieu de l'exemple 2 est avantageusement utilisé pour le transport et la conservation.

10	Acide hyaluronique	
	de haut poids moléculaire	100 mg/l
	Méthylcellulose	2 205 mg/l
	NaCl	5 585 mg/l
	Acides aminés	1 838 mg/l
15	Oligoéléments	5 390 mg/l
	Tampon	8 982 mg/l
	pH	7,2 à 7,3
	Osmolarité	372 mOsm
	Viscosité	5cps (Brookfield, 20°C)

20

**Exemple 3 :** Le milieu de l'exemple 3 est avantageusement utilisé pour le transport et la conservation.

	Acide hyaluronique	
	de haut poids moléculaire	160 mg/l
25	Poloxamer 188	2 205 mg/l
	NaCl	5 585 mg/l
	Acides aminés	1 838 mg/l
	Oligoéléments	5 390 mg/l
	Tampon	8 982 mg/l
30	pH	7,2 à 7,3
	Osmolarité	305 mOsm
	Viscosité	1,5cps (Brookfield, 20°C)

**Exemple 4 :** Le milieu de l'exemple 4 est avantageusement utilisé pour la déturgescence.

5	Acide hyaluronique	
	de haut poids moléculaire	100 mg/l
	Méthylcellulose	2 205 mg/l
	Dextran	50 000 mg/l
	NaCl	6 985 mg/l
10	Acides aminés	1 838 mg/l
	Oligoéléments	5 390 mg/l
	Tampon	8 982 mg/l
	pH	7,2 à 7,3
	Osmolarité	694 mOsm
15	Viscosité	10 cps (Brookfield, 20°C)

**Exemple 5 :** Le milieu de l'exemple 5 est avantageusement utilisé pour la déturgescence.

20	Acide hyaluronique	
	de haut poids moléculaire	100 mg/l
	Méthylcellulose	2 205 mg/l
	Dextran	50 000 mg/l
	NaCl	5 585 mg/l
25	Acides aminés	1 838 mg/l
	Oligoéléments	5 390 mg/l
	Tampon	8 982 mg/l
	pH	7,2 à 7,3
	Viscosité	10 cps (Brookfield, 20°C)

**Exemple 6 :** Le milieu de l'exemple 6 est avantageusement utilisé pour la déturgescence.

Acide hyaluronique	
de haut poids moléculaire	160 mg/l

	Dextran	50 000 mg/l
	NaCl	5 585 mg/l
	Acides aminés	1 838 mg/l
	Oligoéléments	5 390 mg/l
5	Tampon	8 982 mg/l
	pH	7,2 à 7,3
	Osmolarité	595 mOsm
	Viscosité	8,5 cps (Brookfield, 20° C)
10	<b>Exemple 7 :</b> Le milieu de l'exemple 7 est avantageusement utilisé pour la déturgescence.	
	Acide hyaluronique	
	de haut poids moléculaire	160 mg/l
	Poloxamer 188	50 000 mg/l
15	NaCl	5 585 mg/l
	Acides aminés	1 838 mg/l
	Oligoéléments	5 390 mg/l
	Tampon	8 982 mg/l
	PH	7,2 à 7,3
20	Osmolarité	376 mOsm
	Viscosité	5 cps (Brookfield, 20°C)

## MATERIEL ET METHODE

### Déroulement de la conservation

25 Les cornées humaines scientifiques (dons du corps à la science) sont prélevées dans les 24 heures suivant le décès du donneur. Les donneurs ne doivent pas avoir subi de chirurgie intra oculaire, afin de conserver la comparabilité des deux cornées, d'un même donneur. Lors du prélèvement, chaque cornée d'une même paire est immergée dans 50 ml d'un milieu de transport. Il s'agit soit du milieu de référence

30 (Inosol®, Chauvin-Opsia/Bausch and Lomb, Toulouse, France) soit d'un milieu selon l'invention (exemples 1 à 3). Les flacons étanches contenant les cornées sont immédiatement placés en étuve sèche à 31°C. Au deuxième jour de conservation en

oragnoculture, la densité cellulaire endothéliale (DCE) est mesurée selon une procédure décrite plus loin. La cornée est ensuite replongée dans un nouveau flacon de 100 ml du même type de milieu, suspendue à un fil de suture afin d'éviter les contact avec les parois et les sédiments déposés au fond du flacon. Au quatorzième  
 5 jour de conservation, les cornées sont transférées dans un nouveau flacon de 100 ml. Au trentième jour de conservation, durée correspondant au maximum préconisé en Europe, une nouvelle mesure de la DCE est réalisée et la perte cellulaire calculée pour la période dite de conservation. La cornée est ensuite immergée dans 50 ml de milieu dit "de déturgescence" destiné à réduire son épaisseur. Il s'agit d'Exosol®  
 10 (Chauvin-Opsia/Bausch and Lomb) ou d'un milieu selon l'invention (exemples 4 à 7) correspondant avec 50 000 mg/l de DEXTRAN ou 50 000 mg/l de Poloxamer 188. Quarante huit heures après, les deux cornées de la même paire sont photographiées posées côte à côte sur un réseau de 8 traits noirs d'épaisseur croissante et rétro éclairé. Cette photographie sert à l'appréciation de la transparence cornéenne.  
 15 L'épaisseur cornéenne est mesurée à l'apex par pachymétrie ultrasonore (Tomey AL-2000, Tokyo, Japon). Une troisième mesure de la DCE est réalisée, cette fois après incubation pendant 45 secondes avec du rouge alizarine (Sigma) 4% dans du tampon phosphate pH 4,5 destiné à colorer les membranes cellulaires. Cette coloration non vitale ne peut être utilisée qu'en fin de conservation en raison de sa toxicité cellulaire.  
 20 L'ensemble de la procédure est effectuée à l'aveugle concernant la nature du milieu de conservation.

#### **Procédure de respect de l'analyse en aveugle**

Les deux milieux de conservation et de déturgescence sont conditionnés dans  
 25 les mêmes contenants (flacon Nalgène 100ml) et numérotés par une personne ne prenant part, ni à la conservation, ni aux déterminations de DCE. Un système de numérotation d'après une liste de randomisation rend non prévisible l'attribution des milieux en fonction des numéro portés sur les flacons.

#### **Procédure de mesure de la DCE**

30 Après rinçage de la cornée au BSS ( « Balanced Salt Solution », Alcon, Kayserberg, France), l'endothélium est recouvert pendant 1 minute par du bleu trypan 0,4% (Sigma), puis rincé pendant 4 minutes avec du chlorure de sodium 0,9%.

L'endothélium cornéen est alors observé au grossissement x10 sous microscope optique couplé au prototype d'analyseur de la mosaïque endothéliale décrit par Gain P. *et al.* dans Br J Ophthalmol 2002, 86, pages 306-11 et 531-6. Dix images de zones distinctes de l'endothélium sont saisies et archivées sur disque dur pour une analyse différée. Cette analyse porte à chaque fois sur plus de 300 cellules.

## RESULTATS

### Caractéristiques des donneurs

Il s'agit de 6 femmes et 10 hommes dont l'âge est compris entre 57 et 90 ans, avec un âge moyen de 74,4 ans. Le délai entre décès et prélèvement est compris entre 4,5 à 44 heures, avec un délai moyen de 20 ans.

### Résultats

	milieux Opsia	Exemple 1 (conservation) Exemple 4 (déturgescence)
DCE en début de conservation (J2)	1814	1848
DCE en fin de conservation (J30)	1600	1693
perte cellulaire (%)	- 11,8	- 8,4
DCE post déturgescence	1300	1542
perte cellulaire post déturgescence (%)	-18,7	-8,9
épaisseur cornéenne après déturgescence (µm)	703	717

Perte totale en % : milieux Opsia : 30,5 et milieux des exemples 1 et 4 selon l'invention : 17,3

	milieux Opsia	Exemple 2 (conservation) Exemple 5 (déturgescence)
DCE en début de conservation (J2)	1373	1392
DCE en fin de conservation (J30)	1280	1300
perte cellulaire (%)	- 6,8	- 6,7
DCE post déturgescence	980	1163
perte cellulaire post déturgescence (%)		

			-23,4	-10,5
épaisseur	cornéenne	après		
déturgescence ( $\mu\text{m}$ )			723	716

Perte totale en % : milieu Opsia : 30,2 et milieu des exemples 2 et 5 selon l'invention : 17,2

	Milieux	Exemple 3
	Opsia	Exemple 6
DCE en début de conservation (J2)	2441	2190
DCE en fin de conservation (J30)	2239	2090
perte cellulaire (%)	- 8,3	- 4,6
DCE post déturgescence	1573	2255
perte cellulaire post déturgescence (%)	- 29,7	- 3
épaisseur cornéenne après déturgescence (µm)	797	950

Perte totale en % : milieu Opsia : 38 et milieu des exemples 3 et 6 selon

5 l'invention : 7,6

	Milieux	Exemple 3
	Opsia	Exemple 7
DCE en début de conservation (J2)	2788	2602
DCE en fin de conservation (J30)	2239	2370
perte cellulaire (%)	- 29,4	- 8,9
DCE post déturgescence	1928	2088
perte cellulaire post déturgescence (%)	- 2,1	- 11,9
épaisseur cornéenne après	755	832
déturgescence (µm)		

Perte totale en % : milieu Opsia : 31,5 et milieu des exemples 3 et 7 selon

l'invention : 20,8

## DISCUSSION

5       Au terme de cette étude, les inventeurs ont mis au point un milieu défini sans  
composant d'origine animale capable d'assurer sur 30 jours une survie endothéliale  
significativement supérieure à celle obtenue avec le milieu de référence utilisé dans  
10 les banques de cornées. Ce point est primordial car un capital supplémentaire en  
cellules endothéliales de près de 16,9% en moyenne est obtenu, ce qui se traduit par  
une amélioration spectaculaire de la qualité de la conservation. Un tel gain  
permettrait au receveur d'avoir une réserve endothéliale supérieure à ce qu'il était  
possible de lui assurer jusqu'à présent. Cette réserve signifie pour lui une meilleure  
15 résistance aux évènements intercurrents (traumatismes, rejets immunologiques,  
chirurgie endoculaire) et également un allongement de la durée pendant laquelle le  
greffon reste transparent.

      Une étude de substitution du dextran par du poloxamer 188 pour le milieu de  
déturgescence a également été réalisée. Le poloxamer 188 semble moins cytotoxique  
15 que le dextran.



## REVENDEICATIONS

1 - Milieu de conservation d'organes, de tissus biologiques ou de cellules vivantes, caractérisé en ce qu'il contient un acide hyaluronique de haut poids moléculaire et du chlorure de sodium.

5      2 - Milieu de conservation selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il contient :

- de 80 à 4000 mg/l, de préférence 100 à 200 mg/l, préférentiellement 100 à 160 mg/l d'acide hyaluronique de haut poids moléculaire, et
- de 4500 à 9000 mg/l, de préférence de 5500 à 9000 mg/l, préférentiellement 7000 mg/l de chlorure de sodium.

10

3 - Milieu de conservation selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il contient, en outre, du poloxamer 188.

4 - Milieu de conservation selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il contient de 200 à 75000 mg/l, de préférence de 450 à 50000 mg/l de poloxamer 188.

15

5 - Milieu de conservation selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce qu'il contient, en outre, de la méthylcellulose.

6 - Milieu de conservation selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il contient de 210 à 5000 mg/l, de préférence de 1900 à 2500 mg/l et préférentiellement 2205 mg/l de méthylcellulose.

20

7 - Milieu de conservation selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il est exempt de sérum albumine de veau foetal et de protéine d'origine animale.

8 - Milieu de conservation selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il ne contient aucun composant d'origine animale.

25

9 - Milieu de conservation selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il présente une osmolarité de 300 à 465 mOsm  $\pm$  40 mOsm.

10 - Milieu de conservation selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il présente une viscosité Brookfield à 20°C comprise entre 1 et 15 centipoises, de préférence entre 2,5 à 10 centipoises.

30

11 - Milieu de conservation selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il contient en outre une base nutritive biologique liquide, des électrolytes, des acides aminés, des vitamines et un tampon stabilisateur de pH.

12 - Utilisation d'un milieu de conservation selon l'une des revendications 1 à 11 pour la conservation de cornées humaines vivantes.

5 13 - Utilisation d'un milieu de conservation selon l'une des revendications 1 à 11 pour l'organoculture d'organes, de tissus biologiques ou de cellules vivantes, en particulier de cornées humaines vivantes.

14 - Utilisation d'un milieu de conservation selon l'une des revendications 1 à 11 pour le transport d'organes, de tissus biologiques ou de cellules vivantes, en particulier de cornées humaines vivantes.

10 15 - Utilisation d'un milieu de conservation selon l'une des revendications 1 à 11 pour la déturgescence d'organes, de tissus biologiques ou de cellules vivantes, en particulier de cornées humaines vivantes.

**DÉPARTEMENT DES BREVETS**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75006 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 1. / 1..

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 W / 25/0899

<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif)		714520BFRILSA/VI	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0308206	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) MILIEU DE CONSERVATION D'ORGANES, DE TISSUS BIOLOGIQUES OU DE CELLULES VIVANTES			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b> Cabinet BEAU DE LOMENIE 51, Avenue Jean Jaurès B.P. 7073  69301 LYON CEDEX 07			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
<b>Nom</b>		LICARI	
<b>Prénoms</b>		Daniel	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	La Grande Rue	
	<b>Code postal et ville</b>	69930	SAINT CLEMENT LES PLACES
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>Nom</b>		BERTHAULT	
<b>Prénoms</b>		Eve	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	La Grande Rue	
	<b>Code postal et ville</b>	69930	SAINT CLEMENT LES PLACES
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>Nom</b>			
<b>Prénoms</b>			
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>		
	<b>Code postal et ville</b>		
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>			
LYON, le 4 Juillet 2003 S. LE CACHEUX Conseil en P.I. - N° 02-0502		